

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/019628

International filing date: 28 December 2004 (28.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: US  
Number: 60/532,923  
Filing date: 30 December 2003 (30.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 03 February 2005 (03.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

06. 1. 2005

PA 1263209

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

December 21, 2004

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM  
THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK  
OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT  
APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A  
FILING DATE UNDER 35 USC 111.

APPLICATION NUMBER: 60/532,923

FILING DATE: December 30, 2003

By Authority of the  
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS



P. SWAIN  
Certifying Officer

Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it displays a valid OMB control number.

## PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT COVER SHEET

This is a request for filing a PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT under 37 CFR 1.53(c).

Express Mail Label No.  U.S. PTO  
2238  
06/15/2003123003  


## INVENTOR(S)

Given Name (first and middle [if any])	Family Name or Surname	Residence (City and either State or Foreign Country)
Yasuomi	URANO	Tokyo, Japan

Additional inventors are being named on the 1 separately numbered sheets attached hereto

## TITLE OF THE INVENTION (500 characters max)

## 1. SECRETASE COMPLEX FORMATION INHIBITOR

Direct all correspondence to: CORRESPONDENCE ADDRESS

 Customer Number:

38834

OR

<input checked="" type="checkbox"/> Firm or Individual Name	Westerman, Hattori, Daniels & Adrian, LLP			
Address	1250 Connecticut Avenue, N.W.			
Address	Suite 700			
City	Washington	State	DC	Zip
Country	USA	Telephone	202-822-1100	Fax

## ENCLOSED APPLICATION PARTS (check all that apply)

<input checked="" type="checkbox"/> Specification Number of Pages <u>13</u>	<input type="checkbox"/> CD(s), Number _____
<input checked="" type="checkbox"/> Drawing(s) Number of Sheets <u>4</u>	<input type="checkbox"/> Other (specify) _____
<input type="checkbox"/> Application Date Sheet. See 37 CFR 1.76	

## METHOD OF PAYMENT OF FILING FEES FOR THIS PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT

Applicant claims small entity status. See 37 CFR 1.27.

A check or money order is enclosed to cover the filing fees.

The Director is hereby authorized to charge filing fees or credit any overpayment to Deposit Account Number: 50-2866

Payment by credit card. Form PTO-2038 is attached.

FILING FEE  
Amount (\$)

160.00

The invention was made by an agency of the United States Government or under a contract with an agency of the United States Government.

 No. Yes, the name of the U.S. Government agency and the Government contract number are: \_\_\_\_\_

[Page 1 of 2]

Date December 30, 2003REGISTRATION NO. 48,075

(if appropriate)

Docket Number: 032213Respectfully submitted,  
SIGNATURE Sadao Kinashi  
TYPED or PRINTED NAME Sadao KinashiTELEPHONE 202-822-1100

## USE ONLY FOR FILING A PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT

This collection of information is required by 37 CFR 1.51. The information is required to obtain or retain a benefit by the public which is to file (and by the USPTO to process) an application. Confidentiality is governed by 35 U.S.C. 122 and 37 CFR 1.14. This collection is estimated to take 8 hours to complete, including gathering, preparing, and submitting the completed application form to the USPTO. Time will vary depending upon the individual case. Any comments on the amount of time you require to complete this form and/or suggestions for reducing this burden, should be sent to the Chief Information Officer, U.S. Patent and Trademark Office, U.S. Department of Commerce, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. SEND TO: Mail Stop Provisional Application, Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.

If you need assistance in completing the form, call 1-800-PTO-9199 and select option 2.

**PROVISIONAL APPLICATION COVER SHEET**  
**Additional Page**

PTO/SB/16 (08-03)

Approved for use through 07/31/2006. OMB 0651-0032

U.S. Patent and Trademark Office; U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE

Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it displays a valid OMB control number.

Docket Number 032213

**INVENTOR(S)/APPLICANT(S)**

Given Name (first and middle [if any])	Family or Surname	Residence (City and either State or Foreign Country)
Takao	HAMAKUBO	Tokyo, Japan
Tatsuhiko	KODAMA	Tokyo, Japan

[Page 2 of 2]

Number 1 of 1

**WARNING:** Information on this form may become public. Credit card information should not be included on this form. Provide credit card information and authorization on PTO-2038.

## 明細書

 $\gamma$ -セクレターゼ複合体形成阻害剤

## 技術分野

本発明は、コレステロール合成阻害剤を有効成分とする $\gamma$ -セクレターゼ複合体形成阻害剤及び $\gamma$ -セクレターゼ複合体形成阻害作用を測定することを特徴とするコレステロール合成阻害剤のスクリーニング方法に関する。

## 背景技術

老人性痴呆症の代表的疾患であるアルツハイマー病（A D）は、脳の萎縮、老人斑の沈着および神経原線維の形成を特徴とする変性疾患で、神経細胞の脱落が痴呆症状を引き起こすと考えられている（N Engl J Med 2003;348:1356）。A Dでは、1回膜貫通蛋白であるアミロイド前駆体タンパク質（A P P）が、細胞膜に存在する $\alpha$ -セクレターゼよりも脂質ラフト（lipid rafts：スフィンゴ脂質とコレステロールが集積した細胞膜のミクロドメイン）（J Clin Invest. 2002;110:597-603）に存在する $\beta$ -セクレターゼで細胞外部分が切断され、更に $\gamma$ -セクレターゼによつて膜貫通部が切断されてA $\beta$  40、A $\beta$  42ペプチドを生じ、これらのペプチドとりわけ凝集性の強いA $\beta$  42が脳に沈着して神経細胞が脱落し脳の萎縮が生じる。 $\gamma$ -セクレターゼは、 $\beta$ -セクレターゼと同様にラフト結合性を有し脂質ラフトに存在するが、単一の膜貫通蛋白である $\beta$ -セクレターゼと異なり、活性サブユニットであるプレセニリン（presenilin）がニカストリン（nicastrin）、APH-1、Pen-2と $\gamma$ -セクレターゼ複合体を形成し作用する（生体の科学2003;291-296）。セクレターゼの活性はコレステロールレベルの影響を受け、コレステロールレベルの増加は $\alpha$ -セクレターゼ活性を低下させ、 $\beta$ -セクレターゼ活性を上昇させるが、 $\gamma$ -セクレターゼの活性には大きな影響を受けないとされている（Biochem Soc Transact 2002;30:525-529）。コレステロール包接剤（J Lipid Res. 1999;40:781-96）による脂質ラフトからのコレステロールの除去では $\gamma$ -セクレターゼ活性が消失したという報告（Neurobiol Dis. 2002;9:11-23）と影響がなかったという報告（Biochemis

try 2003;42:13977- 86)がある。

HMG-CoA還元酵素阻害剤は、コレステロール生合成の律速段階、HMG-CoAのメバロン酸への転換を触媒する酵素であるHMG-CoA還元酵素を拮抗阻害する薬剤であり、高コレステロール血症治療剤として知られている。HMG-CoA還元酵素阻害剤を服用している患者はAD罹患率が低いというレトロスペクティブな疫学結果が報告され (Arch Neurol 2000;57:1439-1433) 、又、HMG-CoA還元酵素阻害剤は *in vitro*、*in vivo*におけるA $\beta$ ペプチドの生成を低下させたとの結果から、HMG-CoA還元酵素阻害剤がAD治療に有用とする特許が出願されている (WO 02/062824、WO 01/096311、WO 01/32161、WO 00/28981、WO 99/48488、US 6,472,421、US 6,440,387、U.S. 6,080,778)。これらの特許明細書では、HMG-CoA還元酵素阻害剤がAPPのプロセシング即ちセクレターゼ活性の調節を介してA $\beta$ ペプチドの產生を低下させた可能性が述べられているが、 $\gamma$ -セクレターゼ活性の低下、特に脂質ラフトにおける $\gamma$ -セクレターゼ複合体形成の阻害を論じたものは無い。

$\gamma$ -セクレターゼ阻害剤は、本酵素がA $\beta$ 42を產生する酵素であること、活性サブユニットであるプレセニリンの遺伝子変異がAD病の原因となることなどから (Arch Neurol. 2003;60:1541-4)、AD病治療薬として、現在、盛んに検討が行われている (Adv Drug Deliv Rev. 2002;54:1579-88)。しかし、 $\gamma$ -セクレターゼはAPPの他、Notch、ErbB4、CD44、LRPなどを切断し、活性の強いものは副作用を発現する為 (FASEB J 2003;17:79-81)、 $\gamma$ -セクレターゼ阻害剤の開発は必ずしもうまく進んでいない。その一方では、 $\gamma$ -セクレターゼ阻害剤は自己免疫疾患や臓器移植の拒絶反応の予防治療剤としての可能性も期待されている (WO 03/029293)。 $\gamma$ -セクレターゼ阻害作用については、既存の薬物では、一部の非ステロイド性抗炎症剤がA $\beta$ 42の產生を特異的に阻害し、Notchの切断を阻害しないことが報告されている (J Biol Chem 2003;278:30748-30754, 18664-18670)。

## 発明の開示

本発明者らは、 $\gamma$ -セクレターゼの活性を阻害する方法を鋭意研究してきた結果、 $\gamma$ -セクレターゼの活性がコレステロールの存在に依存していること、とりわけ脂質ラフトにおける $\gamma$ -セクレターゼの活性は脂質ラフトにおけるコレステロール

の存在量に濃度依存的に関係していることを見出した。そして、メチルβシクロデキストリンのようなコレステロール包接剤によりコレステロールを除去したり、またコレステロール合成阻害剤等の脂質ラフトのコレステロールの蓄積を減少させ得る薬物の添加により、脂質ラフト上におけるγ-セクレターゼの活性複合体の形成を阻害し、その結果γ-セクレターゼの活性を阻害することを見出した。

すなわち、本発明は、コレステロール合成阻害剤を有効成分とするγ-セクレターゼ複合体形成阻害剤を提供するものである。

また、本発明は、コレステロール合成阻害剤を用いて、γ-セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する方法、より詳細には脂質ラフト上におけるγ-セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する方法を提供するものである。

さらに、本発明は、γ-セクレターゼ複合体形成阻害剤、より詳細には脂質ラフト上におけるγ-セクレターゼの活性複合体の形成阻害剤を製造するためのコレステロール合成阻害剤の使用を提供するものである。

また、本発明は、コレステロールの合成阻害活性を測定することからなる、γ-セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する作用を有する物質をスクリーニングする方法、より詳細には脂質ラフトに蓄積され得るコレステロールの合成阻害活性を測定することからなる、γ-セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する作用を有する物質をスクリーニングする方法を提供するものである。

さらに、本発明は、γ-セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する作用を測定することからなるコレステロール合成阻害剤をスクリーニングする方法、より詳細には脂質ラフトにおけるγ-セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する作用を測定することからなるコレステロール合成阻害剤をスクリーニングする方法を提供するものである。

#### 図面の簡単な説明

図1は、メチルβシクロデキストリン処理後の細胞膜分画のイムノプロティングを示す。図1のAはニカストリンについてのものであり、BはPS1CTFについてのものであり、CはPS2CTFについてのものであり、DはPEN-2についてのものであり、Eはフロチリン-1についてのものである。各々のプロッティン

グの図は、上からメチル $\beta$ シクロデキストリンの濃度が0 mM、1 mM、及び2 mMのものである。

図2は、メチル $\beta$ シクロデキストリンによる細胞膜分画のコレステロール及びタンパク質含量の変化を示したグラフである。四角印(□及び■)はメチル $\beta$ シクロデキストリンの濃度が0 mMの場合を示し、三角印(△及び▲)は1 mMの場合を示し、丸印(○及び●)は2 mMの場合をそれぞれ示す。白抜きの印はコレステロールの量を示し、黒抜きの印はタンパク質の量を示す。グラフの横軸はフラクションの番号を示し、左側の縦軸はコレステロールの量( $\mu$ g/mL)を示し、右側の縦軸はタンパク質の量(mg/mL)を示す。

図3は、HMG-CoA還元酵素阻害剤処理後の細胞膜分画のイムノブロティングを示す。図3のAはニカストリンについてのものであり、BはPS1CTFについてのものであり、CはPS2CTFについてのものであり、Dはフロチリシン-1についてのものである。各々のプロテイングの図は、上からHMG-CoA還元酵素阻害剤の濃度が0 mM、1 mM、及び2 mMのものである。

図4は、HMG-CoA還元酵素阻害剤による細胞膜分画のコレステロール及びタンパク質含量の変化を示したグラフである。四角印(□及び■)はコントロールとしてのメバロン酸250  $\mu$ Mの場合を示し、丸印(○及び●)はコンパクチン(メバロン酸250  $\mu$ M及びコンパクチン50  $\mu$ M)の場合を示し、三角印(△及び▲)はピタバスタチン(メバロン酸250  $\mu$ M及びピタバスタチン5  $\mu$ M)の場合をそれぞれ示す。白抜きの印はコレステロールの量を示し、黒抜きの印はタンパク質の量を示す。グラフの横軸はフラクションの番号を示し、左側の縦軸はコレステロールの量( $\mu$ g/mL)を示し、右側の縦軸はタンパク質の量(mg/mL)を示す。

#### 発明の実施の形態

本発明において、コレステロール合成阻害剤とは、細胞内のコレステロール合成経路を阻害する薬剤であり、HMG-CoA合成酵素阻害剤(Proc Natl Acad Sci USA. 1987;84:7488-92)、HMG-CoA還元酵素阻害剤、スクアレンシンターゼ阻害剤、スクアレンエポキシダーゼ阻害剤、ラノステロール合成酵素阻害剤、フィブリート等のAMPK活性化剤(Biochemical Society Transactions. 1997;25:S676)、及びビスホス

ホネート等のファルネシリピロリン酸合成酵素阻害剤 (Biochem Biophys Res Commun 1999;264:108-111) などが挙げられる。したがって、本発明のコレステロール合成阻害剤としては、HMG-CoA合成酵素阻害剤、HMG-CoA還元酵素阻害剤、スクアレン合成酵素阻害剤、スクアレンエポキシダーゼ阻害剤、ラノステロール合成酵素阻害剤、AMPK活性化剤、及びファルネシリピロリン酸合成酵素阻害剤からなる群から選ばれた 1 種又は 2 種以上の薬剤を使用することができる。これらの薬剤は、製剤学的に必要であれば、塩や溶媒和物として使用することもできる。より具体的には、例えば、ロバスタチン (化学名: (+) - (1S, 3R, 7S, 8S, 8aR) - 1, 2, 3, 7, 8, 8a - ヘキサヒドロ - 3, 7 - ジメチル - 8 - [2 - [(2R, 4R) - テトラヒドロ - 4 - ヒドロキシ - 6 - オキソ - 2H - ピラン - 2 - イル] エチル] - 1 - ナフチル (S) - 2 - メチルブチレート (米国特許第 4, 231, 938 号参照) ) ;

シンバスタチン (化学名: (+) - (1S, 3R, 7S, 8S, 8aR) - 1, 2, 3, 7, 8, 8a - ヘキサヒドロ - 3, 7 - ジメチル - 8 - [2 - [(2R, 4R) - テトラヒドロ - 4 - ヒドロキシ - 6 - オキソ - 2H - ピラン - 2 - イル] エチル] - 1 - ナフチル 2, 2 - ジメチルブタノエート (米国特許第 4, 444, 784 号参照) ) ;

プラバスタチン (化学名: (+) - (3R, 5R) - 3, 5 - ジヒドロキシ - 7 - [(1S, 2S, 6S, 8S, 8aR) - 6 - ヒドロキシ - 2 - メチル - 8 - [(S) - 2 - メチルブチリルオキシ] - 1, 2, 6, 7, 8, 8a - ヘキサヒドロ - 1 - ナフチル] ヘプタン酸 (米国特許第 4, 346, 227 号参照) ) ;

フルバスタチン (化学名: (3RS, 5SR, 6E) - 7 - [3 - (4 - フルオロフェニル) - 1 - (1 - メチルエチル) - 1H - インドール - 2 - イル] - 3, 5 - ジヒドロキシ - 6 - ヘプテン酸 (米国特許第 5, 354, 772 号参照) ) ;

アトルバスタチン (化学名: (3R, 5R) - 7 - [2 - (4 - フルオロフェニル) - 5 - イソプロピル - 3 - フェニル - 4 - フェニルカルバモイル - 1H - ピロール - 1 - イル] - 3, 5 - ジヒドロキシヘプタン酸 (米国特許第 5, 273, 995 号参照) ) ;

セリバスタチン (化学名: (3R, 5S) - エリスロー (E) - 7 - [4 - (4

—フルオロフェニル) —2, 6—ジイソプロピル—5—メトキシメチル—ビリジン—3—イル] —3, 5—ジヒドロキシ—6—ヘプテン酸 (米国特許第5, 177, 080号参照) ) ;

メバスタチン (化学名: (+) —(1S, 3R, 7S, 8S, 8aR) —1, 2, 3, 7, 8, 8a—ヘキサヒドロ—7—メチル—8—[2—[(2R, 4R) —テトラヒドロ—4—ヒドロキシ—6—オキソ—2H—ピラン—2—イル] エチル] —1—ナフチル (S) —2—メチルブチレート (米国特許第3, 983, 140号参照) ) ;

ロスバスタチン (化学名: 7—[4—(4—フルオロフェニル) —6—イソプロピル—2—(N—メチル—N—メタンスルホニルアミノピリミジン) —5—イル] —(3R, 5S) —ジヒドロキシ (E) —6—ヘプテン酸 (米国特許第5, 260, 440号、日本国特許第2, 648, 897号参照) ) ;

ピタバスタチン ((3R, 5S, 6E) —7—[2—シクロプロピル—4—(4—フルオロフェニル) —3—キノリル] —3, 5—ジヒドロキシ—6—ヘプテン酸 (米国特許第5, 856, 336号、日本国特許第2, 569, 746号参照) )

;

又はそれらの塩などが挙げられる。

本発明における好ましいコレステロール合成阻害剤としては、HMG-CoA還元酵素阻害剤が挙げられ、当該HMG-CoA還元酵素阻害剤としては、ロバスタチン、プラバスタチン、シンバスタチン、フルバスタチン、セリバスタチン、アトルバスタチン、ピタバスタチン又はロスバスタチン、及びそれぞれの場合においてその薬学的に許容される塩からなる群から選ばれる化合物が挙げられる。さらに好ましいHMG-CoA還元酵素阻害剤としては、ピタバスタチンが挙げられる。

本発明の $\gamma$ -セクレターゼ複合体形成阻害剤は、有効成分のコレステロール合成阻害剤、及び製薬上許容される担体を含有することができる。

本発明のコレステロール合成阻害剤の投与経路としては、例えば錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等による経口投与又は静脈内注射剤、筋肉内注射剤、坐剤、吸入剤、経皮吸収剤、点眼剤、点鼻剤等による非経口投与が挙げられる。

またこのような種々の剤型の医薬製剤を調製するには、この有効成分を単独で、

又は他の薬学的に許容される賦形剤、結合剤、增量剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、嗜味剤、香料、被膜剤、担体、希釈剤等を1種又はそれ以上と適宜組み合わせて用いることができる。

特に、HMG-CoA還元酵素阻害剤は、これらの投与経路のうち、経口投与が好ましい。経口投与用製剤の調製にあたっては、有効成分の安定性を考慮してpHを調整(特開平2-6406号、日本国特許第2,774,037号、WO97/23200号等参照)するのが好ましい。

これらの医薬の投与量は、患者の体重、年齢、性別、症状等によって異なるが、通常成人の場合、有効成分を一般式(1)で表される化合物として、一日0.01～1000mg、特に0.1～1.00mgを、1回又は数回に分けて経口投与又は非経口投与するのが好ましい。

本発明の $\gamma$ -セクレターゼ複合体形成阻害剤は、脂質ラフトにおける $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害することにより、 $\text{A}\beta 40$ 、 $\text{A}\beta 42$ ペプチド、特に $\text{A}\beta 42$ の産生を抑制し、これらのペプチドの沈着に起因する各種の疾患、例えば、アルツハイマー病(AD)などの予防・治療に有用である。

本発明の $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する方法としては、培養細胞や生体系などの被処理系に本発明のコレステロール合成阻害剤を添加することにより行うことができる。本発明のこの方法は、特に脂質ラフト上における $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する方法を提供するものである。

本発明のコレステロールの合成阻害活性を測定する方法としては、コレステロールの合成量を測定できる方法であればよく、特に細胞中の脂質ラフトにおけるコレステロールの蓄積量を測定できる方法が好ましい。より具体的には、標識化又は非標識化されたコレステロール合成源を含有する培地内で、スクリーニング物質の存在又は非存在下で細胞を培養し、所定時間後における細胞中、特に脂質ラフト中におけるコレステロールの含有量を測定することにより行うことができる。このようにして、コントロールとの比較により、スクリーニング物質がコレステロール合成阻害活性を有するか否かを決定することができる。そして、本発明によれば、このようにしてスクリーニング物質のコレステロール合成阻害活性を測定すること

により、当該スクリーニング物質が $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する作用を有するか否かをスクリーニングすることができる。

また、本発明の $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する作用を測定する方法としては、例えば、脂質ラフトを分離し、その中に含まれる $\gamma$ -セクレターゼの構成成分を測定する方法が挙げられる。脂質ラフトを分離する具体的方法としては、細胞膜分画を界面活性剤で処理する方法、蔗糖密度勾配法により分画する方法及びそれらの組み合わせが挙げられる。 $\gamma$ -セクレターゼの構成成分を測定する具体的方法としてはプレセニリン、ニカストリン、APH-1又はPen-2を免疫学的に測定する方法が挙げられる。

#### 実施例

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら限定されるものではない。

##### 1：細胞の培養

SH-SY5Y細胞 (Invitrogen) は、完全培地 (10%ウシ胎児血清 (Sigma) 、100 units/mLペニシリンおよび100 mg/mLストレプトマイシンを含むDMEM (Sigma) ) で37°Cで15 cm径ディッシュに継代培養した。

##### 2：detergent insoluble membrane domain (raft)の調製

SH-SY5Y細胞を15 cm径ディッシュに培養し、コンフレントになったものについてPBSで洗浄した。さらにセルスクレイパーを用いてPBS中に細胞を回収し、1000gで、5分間遠心した。沈殿した細胞を200  $\mu$ Lの2% CHAPSとComplete protease mixture (Roche) を含むbuffer R (20 mM Tris-HCl pH 7.6、150 mM NaCl、1mM EDTA) に懸濁した。氷上に20分間静置することで可溶化を行った。可溶化後、800  $\mu$ Lの56.25% sucroseを含むbuffer Rを加え、終濃度が45% sucrose、0.4% CHAPSとなるように希釈し、遠心用チューブの底に添加した。さらにその上に3mLの35% sucroseを含むbuffer Rを重ね、続けて1 mLの5% sucroseを含むbuffer Rを重ねた。ベックマン超遠心器によりSW55ローターで100,000g (32,000 rpm) で、4°Cで16時間遠心後、上部より500  $\mu$ Lずつ分取した。

##### 3：SDS-PAGEとイムノプロティング

前記の2で分取した各画分についてSDS-PAGE後、イムノプロティングを行った。ニカストリンを認識する抗体としてニカストリン(N-19)(santa cruz)、プレセニリン1のC端側を認識する抗体としてanti-G1L3、プレセニリン2のC端側を認識する抗体としてanti-G2L、PEN-2を認識する抗体としてanti-PNT3、flotillin-1を認識する抗体としてFlotillin-1(BD sciences)、カルネキシンを認識する抗体としてカルネキシン(BD biosciences)を用いた。

室温で1時間、または4℃で終夜反応させた後、TBS-tween(20 mM Tris-buffered saline, pH7.4, 0.05% Tween 20)で2回洗浄を行った。つぎにHRP結合型抗マウスIgG抗体、または抗ヤギIgG抗体、または抗ウサギIgG抗体で1時間反応させ、TBS-tweenで洗浄した。さらにSupersignal west dura(pierce)で化学発光させ、X線フィルムに感光させた。

#### 実施例1 メチルβシクロデキストリンによる処理(図1、図2参照)

SH-SY5Y細胞を15cm径ディッシュに培養し、コンフレントになったものについてPBSで洗浄後、メチルβシクロデキストリン(sigma)を最終濃度が0~2 mMとなるよう溶かしたDMEMを加え、37℃でさらに30分間培養を行った。これらの細胞について前記した2に記載の方法に準じて分画を行い、イムノプロティングを行った。メチルβシクロデキストリンによりコレステロールが脂質ラフト(フラクション3)より除去され(図2)脂質ラフトのマーカータンパクであるフロティリンが本来の脂質ラフト分画であるフラクション3からフラクション9及び10に移行した(図1E参照)。同様にγ-セクレターゼの構成成分であるニカストリン、プレセニリン1、プレセニリン2及びPen-2が脂質ラフト分画(フラクション3)から消失した(図1A、B、C及びD参照)。これによって、メチルβシクロデキストリンは脂質ラフトからコレステロールを引き抜くことによりラフト構造を破壊し、脂質ラフトにおけるγ-セクレターゼの活性複合体の形成を阻害することが確認された。

#### 実施例2 HMG-CoA還元酵素阻害剤処理による(図3、図4参照)

SH-SY5Y細胞を15cm径ディッシュに培養し、コンフレントになる前の細胞につい

て、PBSで洗浄した。DMEMに5% LPDS、250  $\mu$  Mのメバロン酸を加え、さらにコレステロールの生合成の阻害剤として50  $\mu$  Mのコンパクチンまたは5  $\mu$  Mのピタバスタチンを加えた培地を調製し、48時間培養した。これらの細胞について前記した2に記載の方法に準じて分画を行い、イムノプロティングを行った。HMG-CoA還元酵素阻害剤であるコンパクチン及びピタバスタチンにより脂質ラフト（フラクション3）のコレステロールが減少し（図3参照）、実施例1と同様に $\gamma$ -セクレターゼの構成成分であるニカストリン、プレセニリン1及びプレセニリン2が脂質ラフト分画（フラクション3）から消失した（図3 A、B及びC参照）。フロティリンは脂質ラフト分画に未だ残っておりラフト構造は保たれているが、コンパクチン及びピタバスタチンは脂質ラフトにおける $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害することが確認された。

## 請求の範囲

1. コレステロール合成阻害剤を有効成分とする $\gamma$ -セクレターゼ複合体形成阻害剤。
2. コレステロール合成阻害剤が、HMG-CoA合成酵素阻害剤、HMG-CoA還元酵素阻害剤、スクアレン合成酵素阻害剤、スクアレンエポキシダーゼ阻害剤、ラノステロール合成酵素阻害剤、AMPK活性化剤、及びファルネシルピロリン酸合成酵素阻害剤からなる群から選ばれた1種又は2種以上の薬剤である請求項1に記載の $\gamma$ -セクレターゼ複合体形成阻害剤。
3. コレステロール合成阻害剤が、HMG-CoA還元酵素阻害剤である請求項1に記載の $\gamma$ -セクレターゼ複合体形成阻害剤。
4. コレステロール合成阻害剤が、ピタバスタチンである請求項1に記載の $\gamma$ -セクレターゼ複合体形成阻害剤。
5. コレステロール合成阻害剤を用いて、 $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する方法。
6. 脂質ラフト上における $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する方法である請求項5に記載の方法。
7. コレステロール合成阻害剤が、HMG-CoA合成酵素阻害剤、HMG-CoA還元酵素阻害剤、スクアレン合成酵素阻害剤、スクアレンエポキシダーゼ阻害剤、ラノステロール合成酵素阻害剤、AMPK活性化剤、及びファルネシルピロリン酸合成酵素阻害剤からなる群から選ばれた1種又は2種以上の薬剤である請求項5に記載の $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する方法。
8. コレステロール合成阻害剤が、HMG-CoA還元酵素阻害剤である請求項5に記載の $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する方法。
9. コレステロール合成阻害剤が、ピタバスタチンである請求項5に記載の $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する方法。
10.  $\gamma$ -セクレターゼ複合体形成阻害剤を製造するためのコレステロール合成阻害剤の使用。
11.  $\gamma$ -セクレターゼ複合体形成阻害剤が、脂質ラフト上における $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害するものである請求項10に記載の使用。

12. コレステロール合成阻害剤が、HMG-CoA合成酵素阻害剤、HMG-CoA還元酵素阻害剤、スクアレン合成酵素阻害剤、スクアレンエポキシダーゼ阻害剤、ラノステロール合成酵素阻害剤、AMPK活性化剤、及びファルネシルピロリン酸合成酵素阻害剤からなる群から選ばれた1種又は2種以上の薬剤である請求項10に記載の使用。

13. コレステロール合成阻害剤が、HMG-CoA還元酵素阻害剤である請求項10に記載の使用。

14. コレステロール合成阻害剤が、ピタバスタチンである請求項10に記載の使用。

15. コレステロールの合成阻害活性を測定することからなる、 $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する作用を有する物質をスクリーニングする方法。

16. コレステロールの合成阻害活性が、脂質ラフトに蓄積され得るコレステロールの合成阻害活性である請求項15に記載のスクリーニング方法。

17. コレステロールの合成阻害活性が、HMG-CoA合成酵素の阻害活性、HMG-CoA還元酵素の阻害活性、スクアレン合成酵素の阻害活性、スクアレンエポキシダーゼの阻害活性、ラノステロール合成酵素の阻害活性、AMPKの活性化、及びファルネシルピロリン酸合成酵素の阻害活性からなる群から選ばれたコレステロールの合成阻害活性である請求項15に記載のスクリーニング方法。

18. コレステロールの合成阻害活性が、HMG-CoA還元酵素の阻害活性である請求項15に記載のスクリーニング方法。

19.  $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する作用を測定することからなるコレステロール合成阻害剤をスクリーニングする方法。

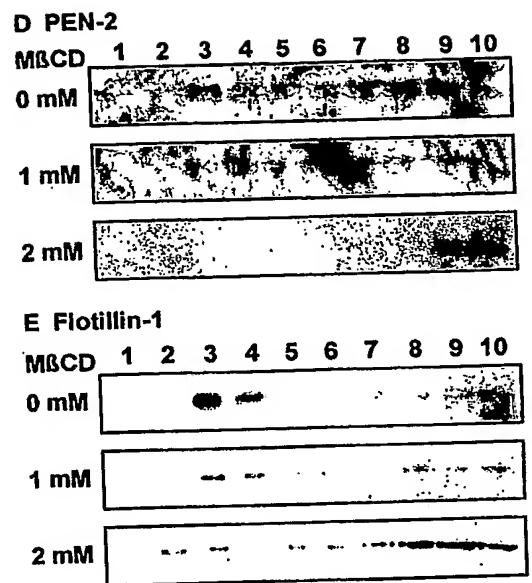
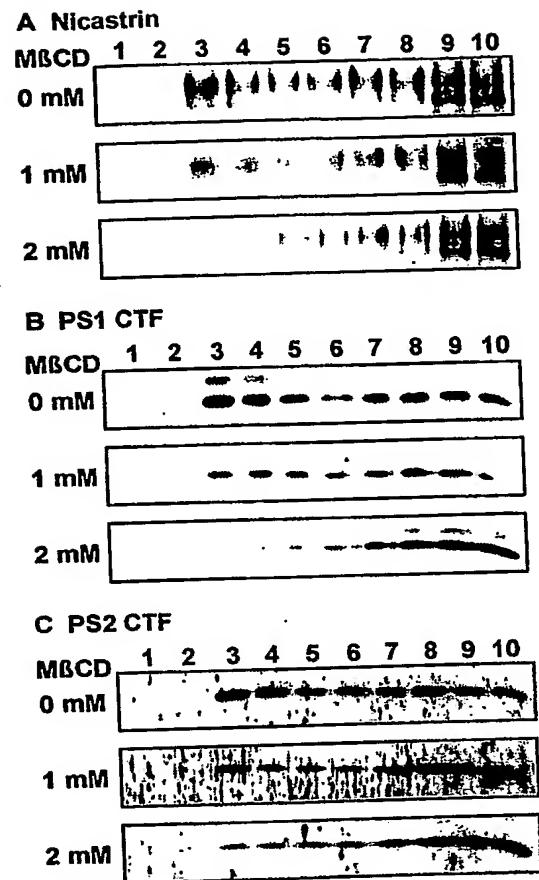
20.  $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する作用を測定することからなる、HMG-CoA合成酵素阻害剤、HMG-CoA還元酵素阻害剤、スクアレン合成酵素阻害剤、スクアレンエポキシダーゼ阻害剤、ラノステロール合成酵素阻害剤、AMPK活性化剤、及びファルネシルピロリン酸合成酵素阻害剤からなる群から選ばれたコレステロール合成阻害剤をスクリーニングする方法。

21.  $\gamma$ -セクレターゼの活性複合体の形成を阻害する作用を測定することからなる、HMG-CoA還元酵素阻害剤をスクリーニングする方法。

## 要約書

本発明は、コレステロール合成阻害剤を有効成分とする $\gamma$ -セクレターゼ複合体形成阻害剤及び $\gamma$ -セクレターゼ複合体形成阻害作用を測定することを特徴とするコレステロール合成阻害剤のスクリーニング方法を提供する。

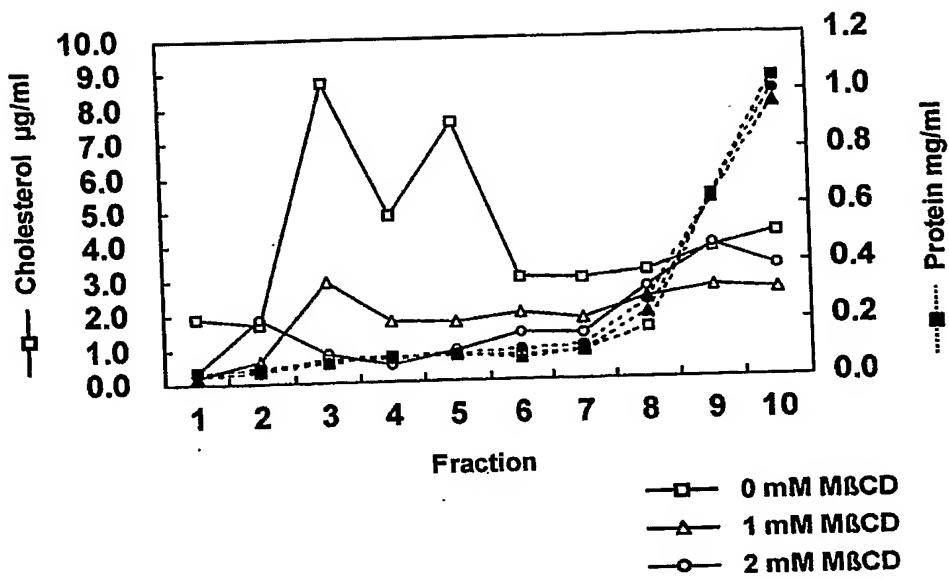
【図 1】



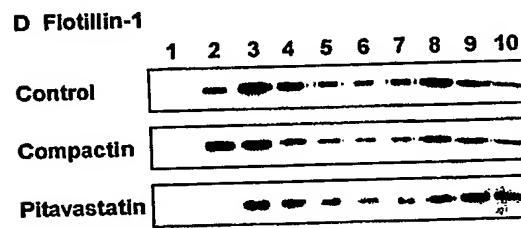
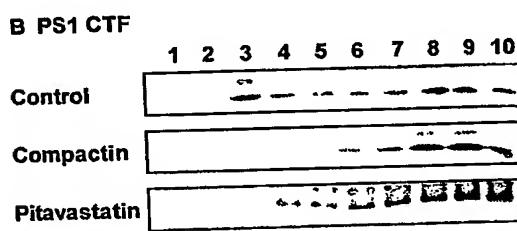
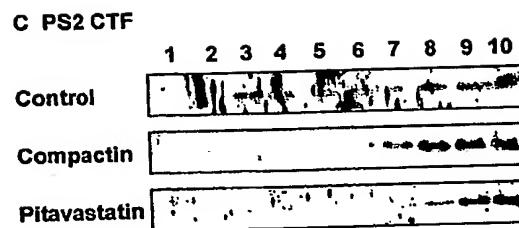
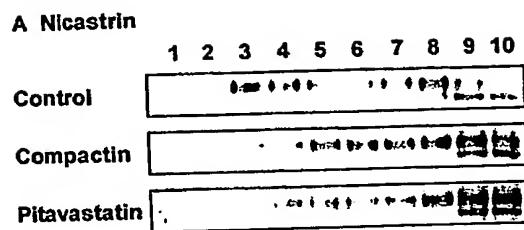
DMEM +0~2 mM MβCD,  
37°C, 30min incubation

BEST AVAILABLE COPY

【図 2】



【図3】



【図 4】

